

## L'ANGIOGENESI NEL SISTEMA NERVOSO ANGIOGENESIS IN THE NERVOUS SYSTEM

<sup>1</sup>Gabriella Schiera, <sup>1</sup>Patrizia Saladino, <sup>2</sup>Patrizia Proia

<sup>1</sup>Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche  
Sezione di Scienze Biochimiche

<sup>2</sup>Studi giuridici Economici, Biomedici, Psicosociopedagogici delle Scienze  
Motorie Sportive (DISMOT) - Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy

SOMMARIO: 1. Introduzione. – 2. Meccanismi dell'angiogenesi. – 3. L'angiogenesi nella sclerosi multipla. - Bibliografia

**Abstract Italiano:** L'argomento affrontato in questa review ha l'obiettivo di richiamare l'attenzione della comunità scientifica su quanto di noto esiste sull'angiogenesi nel sistema nervoso centrale. Negli ultimi anni, il processo angiogenetico e la sua attivazione, sono stati sempre più spesso correlati con la progressione di molte malattie quali ad esempio quelle a carico del sistema nervoso. Nella prima parte della review abbiamo effettuato una panoramica sull'angiogenesi e sui meccanismi d'azione ad essa associati. Nella seconda parte, come esempio della correlazione tra l'attivazione del processo angiogenetico e la progressione di una malattia a carico del sistema nervoso, abbiamo analizzato la sclerosi multipla (SM), malattia cronica neurodegenerativa. E' stata suggerita un'associazione tra lesioni da SM e neurovascolarizzazione. Evidenze scientifiche propongono che essa non sia soltanto un epifenomeno (ossia un fenomeno accessorio a quello principale) ma rappresenti, invece, un meccanismo patologico che contribuisce direttamente a determinare la malattia.

**Abstract English:** The topic of this review was synthesized all of known about the angiogenesis in nervous system. In the last years, the correlation between angiogenic process, his activation and progression of some disease was increased, particularly in nervous system. In the first part of this review, we showed an overview about angiogenesis and mechanism of activation of this process, focused in nervous system. In the second part, we analyzed multiple sclerosis (MS), a chronic neurodegenerative disease, as example of the correlation between progression of angiogenesis and a neurological disease. There are a lot of evidence in which there could be a relationship between multiple sclerosis lesions and neurovascular progression. The hypothesis is that angiogenesis is not a

## SEZIONE 2

secondary phenomenon but a pathological mechanism that support directly the development of the disease.

**Parole chiave:** angiogenesi, sistema nervoso, fattori angiogenici, sclerosi multipla, riparo neurale

**Keywords:** angiogenesis, nervous system, angiogenic factors, multiple sclerosis, neural repair

### 1. Introduzione

Durante il normale sviluppo dell'embrione, la formazione di vasi sanguigni è essenziale sia per il rifornimento di tessuti e organi con adeguate quantità di nutrienti e ossigeno sia per la rimozione dei cataboliti.

La vascolarizzazione è uno dei primi sistemi che si formano durante l'embriogenesi. Il primo stadio prevede il differenziamento di un comune precursore cellulare, emangioblasto, in cellule endoteliali (EC) delle pareti dei vasi ed in cellule ematopoietiche del sangue, definiti angioblasti.

La formazione dei vasi sanguigni avviene attraverso due processi: vasculogenesi e angiogenesi (Risau et al, 1997; Beck et al, 1997).

La formazione *de novo* di una rete vascolare primitiva è chiamata "vasculogenesi". Tale processo può, comunque, avvenire anche nell'adulto, in cui vasi di nuova formazione possono crearsi da cellule endoteliali progenitrici in circolazione, che sono in grado di formare canali endoteliali (Carmeliet, 2000). Il sistema vascolare così formato evolve dal plesso capillare primario tramite susseguenti rimaneggiamenti e riorganizzazioni delle cellule endoteliali, attraverso un processo chiamato "angiogenesi" (Risau, 1997).

Il termine angiogenesi fu introdotto da Herting nel 1935 per descrivere un processo di vascolarizzazione della placenta. In realtà l'angiogenesi è la formazione di nuovi vasi sanguigni da un letto vascolare già esistente. Fisiologicamente, essa è probabilmente regolata sia da sostanze angiogeniche che da sostanze angiostatiche, che si mantengono in equilibrio dinamico. In risposta allo stimolo da parte dei fattori angiogenici, le cellule endoteliali cambiano morfologia; inoltre, si apprezza un cambiamento nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi ed un incremento della quantità dei mitocondri.

In aggiunta al ruolo svolto durante lo sviluppo, l'angiogenesi è richiesta per il mantenimento dell'integrità funzionale e strutturale dell'organismo nella vita post-natale. In questo caso, il processo è strettamente regolato e limitato dalla richiesta metabolica del tessuto di riferimento.

L'angiogenesi può essere distinta in due fasi separate, ma bilanciate: una fase di attivazione, che include l'incremento della permeabilità vascolare, la degradazione della membrana basale, la proliferazione e la migrazione delle EC, ed una fase di risoluzione, che include l'inibizione della proliferazione e migrazione delle EC, la ricostruzione della membrana basale e la stabilizzazione

del vaso attraverso il reclutamento ed il differenziamento di cellule mesenchimali in periciti e cellule muscolari lisce (SMC).

La membrana basale dei capillari e la circostante matrice extracellulare (ECM) sono degradate da enzimi proteolitici, come le metalloproteinasi (MMP) e la plasmina.

Le MMP degradano il collagene e gli altri componenti della matrice extracellulare e distruggono la barriera formata dalla membrana basale, permettendo la migrazione delle cellule endoteliali da vasi preesistenti sotto l'effetto di stimoli angiogenetici e proliferativi (Moses, 1997). L'angiogenesi è, quindi, data da una serie di eventi altamente coordinati che iniziano con la vasodilatazione e l'incremento della permeabilità vascolare, primariamente indotto dalla produzione di ossido nitrico.

Il fattore di crescita delle cellule endoteliali vascolari (VEGF), che è un importante mediatore dell'angiogenesi ed in particolare un regolatore della permeabilità vasale, è trascrizionalmente regolato in risposta alla produzione di ossido nitrico.

L'incremento della permeabilità vasale permette il passaggio di proteine plasmatiche nello spazio extravascolare e la deposizione di una matrice sulla quale potranno propagarsi le cellule endoteliali.

La deregolazione della permeabilità vasale può anche evolvere in uno stato patologico. Tuttavia, esiste un fattore con effetto opposto, l'angipoietina-1 (Ang1), che bilancia normalmente l'effetto del VEGF sulla permeabilità vasale (Thurston et al, 1999, 2000).

In seguito alla migrazione e alla proliferazione, le cellule endoteliali si assemblano in tubi che presentano un lume. La formazione di questo lume dipende dalla E-selectina, una glicoproteina transmembrana di adesione, che media i contatti cellula-cellula.

Il tubo nascente forma una rete vascolare primaria di piccoli vasi sanguigni; in seguito, si ha un rimodellamento che porta alla formazione di vasi sanguigni maturi e più grandi. Un passo importante nella formazione di vasi maturi è il reclutamento di cellule mesenchimali e il loro successivo differenziamento in cellule simili alle cellule muscolari lisce e ai periciti, che stabilizzano il sistema vascolare di nuova formazione.

I periciti sono gradualmente ancorati al plesso endoteliale preformato e ciò porta ad una progressiva copertura dell'albero vascolare (Benjamin, 1998). Questo stadio tardivo della formazione dei vasi sanguigni è caratterizzato da fasi di rimodellamento in cui i vasi non protetti da periciti sono distrutti, mentre quelli coperti dai periciti sono stabilizzati e perdono la suscettibilità alla destabilizzazione ed alla regressione (Klagsburn et al, 1999).

Il reclutamento da parte dei vasi sanguigni più maturi di cellule di supporto, periciti per i vasi più piccoli e cellule muscolari lisce per vasi più grandi, serve a stabilizzare i nuovi vasi e gioca un ruolo fondamentale nell'inibizione della proliferazione continua delle cellule endoteliali. Questo strato di supporto fornisce

## SEZIONE 2

inoltre segnali di sopravvivenza che proteggono le cellule dalla regressione vascolare (Carmeliet, 2000).

Il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF), insieme ai suoi recettori e all'angiotensina-1, gioca un ruolo fondamentale nel reclutamento dei periciti. La deregolazione e la perdita di questo reclutamento causa anomalie della morfologia vasale e della rete vascolare (Hellstrom et al, 1999). L'aggiunta di uno strato spesso di cellule muscolari conferisce alle arterie più grandi proprietà viscoelastiche ed un controllo vasomotorio del diametro del vaso (neuromuscolare). Inoltre, una nuova lamina basale si forma attorno ai vasi per fornire un ulteriore supporto.

L'angiogenesi dipende in maniera critica dall'interazione delle EC con la matrice extracellulare (ECM). Evidenze sperimentali hanno dimostrato l'importanza dell'integrazione dei segnali dovuti a fattori di crescita con quelli provenienti dalla ECM, come supporto della proliferazione e della migrazione cellulare; esiste cioè una interazione dinamica tra EC, fattori angiogenici ed ECM.

Importanti mediatori della morfologia dei nuovi vasi sono le integrine, che possono direttamente associarsi con i recettori dei fattori di crescita, regolando così la capacità di propagare il segnale da parte del complesso "recettore del fattore di crescita-integrina".

Ad esempio, un importante mediatore è l'integrina  $\alpha_v\beta_3$ , recettore per proteine contenenti il motivo Arg-Gly-Asp(RGD), presente anche nella fibronectina, la quale è espressa a bassi livelli nei vasi sanguigni quiescenti (Eliceiri, 1998). In seguito all'esposizione delle cellule endoteliali dei capillari di nuova formazione a fattori che stimolano l'angiogenesi, viene indotta l'espressione dell'integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

Gli antagonisti dell'integrina  $\alpha_v\beta_3$  inibiscono la crescita di nuovi vasi sanguigni, ma non di quelli già esistenti; ciò suggerisce che l'adesione cellulare sia anche un fattore determinante nell'angiogenesi (Brooks, 1994). Un sito regolativo critico sarebbe, in particolare, rappresentato dalle adesioni cellula-cellula e dal complesso vascolare endoteliale (VE)-caderine. Questo complesso media le funzioni barriera delle cellule endoteliali e l'angiogenesi e, probabilmente, supporta il dialogo con i recettori del VEGF (VEGFR).

Le integrine hanno un ruolo fondamentale nella trasduzione di segnali, avviati dalla ECM, al complesso macchinario di segnalazione intracellulare. Il legame all'integrina induce, infatti, un ampio spettro di segnali intracellulari, come l'attivazione di Ras, MAP chinasi, chinasi delle adesioni focali (FAK) e fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K) (Aplin et al, 1998). Inoltre, si osserva un aumento del pH intracellulare e dei livelli di calcio, la sintesi delle cicline, l'espressione di geni precoci e si ottiene complessivamente un potenziamento della sopravvivenza cellulare. Interessante è, comunque, il fatto che molte delle vie di trasduzione del segnale e degli effettori attivati dal legame all'integrina siano anche attivati in seguito alla stimolazione delle cellule da parte di fattori di

crescita (Meredith Jr et al, 1993). Ciò suggerisce che integrine e fattori di crescita possano dare risposte cellulari sinergiche e coordinate.

Benché responsabili dell'adesione delle cellule alla matrice extracellulare siano fondamentalmente le integrine, è gradualmente emerso anche un ruolo importante dei fattori di crescita. La proliferazione, l'adesione e la migrazione indotta dai fattori di crescita, in modelli di colture cellulari, spesso richiedono però specifiche integrine.

Ad esempio, una stimolazione ottimale dell'adesione cellulare è ottenuta con il fattore di crescita epidermico (EGF), il PDGF, l'insulina o il VEGF, purché esista la mediazione delle integrine in un appropriato dominio della matrice. Recentemente, l'integrina  $\alpha_v\beta_3$  è stata co-immunoprecipitata con il recettore del VEGF e con quello del PDGF; inoltre, dati scientifici hanno dimostrato che VEGF promuove l'adesione e la migrazione di colture di cellule endoteliali *via*  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_v$  e  $\beta_3$ .

E' anche interessante notare come il fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF), ma non il fattore di crescita insulino-simile (IGF) o il PDGF, potenzi *in vitro* la migrazione e l'adesione delle cellule endoteliali (Byzova et al, 2000). Tutto ciò suggerisce che la ECM fornisca "suggerimenti" alle cellule dei tessuti in attivo rimodellamento e/o sviluppo, oltre a fornire un supporto fisico e precise funzioni barriera.

L'esame dei segnali trasdotti dalle molecole di adesione cellulare all'interno delle cellule endoteliali rivela un meccanismo in cui le cellule possono processare gli stimoli prodotti dai fattori di crescita per trasformarli poi in cascate di fosforilazioni intracellulari, regolazione dei livelli di espressione genica e attività enzimatiche associate alla ECM. Il coordinamento delle risposte a tutti questi segnali può determinare *in vivo* i processi di migrazione cellulare, proliferazione e differenziamento (Eliceiri et al, 2001).

Durante lo sviluppo, viene organizzata la rete vascolare e, in seguito, le cellule endoteliali diventano quiescenti in molti tessuti; al di fuori del sistema nervoso e negli adulti normali, esse possono essere molto longeve. Solo lo 0,01% delle cellule endoteliali subisce divisione.

La produzione di VEGF può essere anche regolata dai livelli di ossigeno e di ossido nitrico.

Il risanamento tissutale comincia in seguito al danno di un tessuto che risponde con la produzione dei fattori FGF-1 ed FGF-2. Sembra che si crei così un ambiente ipossico che, a sua volta, induce una stimolazione della produzione di VEGF. In seguito, specifiche componenti della matrice extracellulare sono degradate in risposta al rilascio di specifici enzimi e, di conseguenza, si accumulano frammenti di collagene, fibronectina ed elastina.

## 2. Meccanismi dell'angiogenesi

Molti tessuti hanno note proprietà angiogeniche. Tra questi, i vasi del cervello di mammifero, la retina, le ovaie, i testicoli, le ghiandole salivari ed il

## SEZIONE 2

fegato. Una capacità simile è anche mostrata dagli adipociti, dalle cellule epidermiche, dai macrofagi e dai linfociti T.

Il mantenimento dell'omeostasi vascolare è considerato un processo attivo e continuo, controllato da molti fattori, che stimolano e inibiscono l'angiogenesi (Folkman et al, 1987; Maragoudakis et al, 1994).

Uno dei principali fattori angiogenici coinvolti sia in processi fisiologici che in eventi patologici è il VEGF, prodotto dalle cellule endoteliali, dai macrofagi, dai fibroblasti e dalle cellule muscolari lisce. Esso promuove la proliferazione delle cellule endoteliali stimola la permeabilità vascolare.

Il VEGF promuove l'angiogenesi sia direttamente che indirettamente. Agisce in modo diretto come mitogeno specifico e potente chemoattrattante delle cellule endoteliali ed amplificando la permeabilità vascolare. Agisce in modo indiretto inducendo le cellule endoteliali al rilascio di altri fattori come MMP e ICAM-1, coinvolti nel processo angiogenico (Radisavljevic et al, 2000).

La famiglia dei VEGF comprende cinque membri che esplicano le proprie funzioni attraverso il legame con tre tipi di recettori, ai quali si è affiancato recentemente un corecettore neuropilina-simile. Il gene umano per il VEGF è organizzato in otto esoni separati da sette introni, la regione codificante ha una dimensione di circa 14 Kb (Josko et al, 2000).

Il primo dei cinque membri, VEGF-A, è quello meglio caratterizzato. Ad oggi sono cinque le isoforme di VEGF-A identificate: VEGF206, VEGF189, VEGF145, VEGF165 e VEGF121, derivanti da fenomeni di "splicing" alternativo. Le ultime due isoforme si trovano in modo specifico nel sistema nervoso centrale e stimolano la mitogenesi e la permeabilità vascolare, mentre le prime due isoforme aumentano solo la permeabilità vascolare. VEGF165 è l'isoforma meglio caratterizzata ed è la più rappresentata nell'uomo; è una proteina legante eparina, presente in molti tessuti e tumori (Plate et al, 1997).

In generale i fattori VEGF sono agenti mitogeni per le cellule endoteliali vascolari derivanti dalle arterie ed hanno un effetto regolativo sulle cellule del sangue. Clauss et al. nel 1990, hanno dimostrato che i fattori VEGF promuovono la chemiotassi dei monociti. E' stato, inoltre, dimostrato che i VEGF sono regolatori fondamentali degli emangioblasti, comuni precursori ancestrali delle cellule endoteliali ed emopoietiche: infatti, in presenza di VEGF, alcune cellule differenziano nella linea endoteliale.

La forma nativa di VEGF è una glicoproteina dimerica basica, legante eparina, di 45KDa; queste caratteristiche corrispondono all'isoforma più studiata, la 165. Essa è per lo più secreta in forma solubile, ma una frazione significativa rimane legata alla superficie cellulare ed alla matrice extracellulare.

Altro membro della famiglia VEGF è la forma B, proteina espressa ad alti livelli nel muscolo; VEGF-B è un ligando basico, in grado di legare il recettore VEGFR-1 e la neuropilina-1. Sono note due isoforme di VEGF-B: la 167, peptide solubile, e la 189 che è legata alla matrice extracellulare. Questi fattori di crescita possono esistere come omodimeri, o come eterodimeri con VEGF-A.

VEGF-C è coinvolto nella regolazione della formazione dei vasi del sistema linfatico (Jeltsch et al, 1997).

Gli altri due membri della famiglia sono VEGF-D e VEGF E. Mentre il primo stimola l'angiogenesi del sistema linfatico, il secondo è simile alla forma A e stimola la proliferazione, la migrazione e la formazione di tubuli.

Le attività delle varie forme di VEGF sono mediate da recettori a tirosina chinasi, ad alta affinità (RTKs), presenti soprattutto nelle cellule endoteliali. Sono due le isoforme identificate: Flk-1 e Flk1/KDR ( VEGFR-1 e 2) (Yamaguchi et al, 1993).

E' stata recentemente scoperta l'esistenza di un ulteriore recettore del VEGF (ed in particolare dell'isoforma A165 e delle forme B ed E): la neuropilina-1, una glicoproteina transmembrana di 130 kDa, presente negli assoni durante lo sviluppo del sistema nervoso; essa è espressa nel sistema cardiovascolare e in quello scheletrico, ma anche nelle cellule endoteliali adulte, nelle cellule tumorali e in altri tessuti diversi. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che la neuropilina ha la funzione di presentare l'isoforma 165 al recettore Flk-1/KDR, in modo da aumentare l'effetto sulla traduzione del segnale mediato da Flk-1/KDR (Ferrara, 1999; Miao, 2000).

Fra i fattori angiogenetici, i fattori di crescita dei fibroblasti (FGF) agiscono in modo pleiotropico su differenti tipi cellulari, incluse le cellule endoteliali, in seguito all'interazione con i proteoglicani contenenti eparan-solfato e con i recettori a tirosina chinasi per FGF (FGFR), che si trovano nella membrana delle cellule bersaglio. La forma acida e quella basica dell'FGF (FGF-1 ed FGF-2) sono entrambe potenti induttori della migrazione delle cellule endoteliali *in vitro*, della proliferazione e della formazione di tubuli, mentre *in vivo* sono altamente angiogenetiche (Klagsburn et al, 1991).

Gli FGF sono una famiglia di piccole proteine di 20-30 kDa, spesso glicosilate. La trasduzione del corrispondente segnale è mediata da una famiglia di quattro recettori transmembrana a tirosina chinasi (FGFR). La presentazione dell'FGF al recettore è fondamentale per la sua attivazione ed è stimolata da un cofattore, che è un glicosaminoglicano solfato.

Evidenze sperimentali mostrano che differenti membri della famiglia degli FGF, ma prevalentemente FGF-1 e FGF-2, possono indurre *in vitro* l'acquisizione da parte delle cellule endoteliali di un fenotipo angiogenico che riassume molti aspetti del processo di angiogenesi *in vivo*, inclusa la modulazione della proliferazione delle EC e della loro migrazione, la produzione di proteasi, l'espressione di caderine ed integrine e la comunicazione cellulare attraverso giunzioni strette (Javerzat et al, 2002).

L'attivazione da parte dei fattori FGF dei recettori FGFR1 e 2 guida le cellule endoteliali verso la proliferazione. Il reclutamento di questi recettori e la loro conseguente fosforilazione attiva molte vie di trasduzione del segnale parallele: oltre all'attivazione della via che coinvolge le MAP chinasi, è richiesta un'attivazione più a lungo termine della protein chinasi C (PKC) affinché FGF2

## SEZIONE 2

possa esercitare una risposta mitogenica sulle cellule endoteliali (Presta et al, 1991): la regolazione negativa di PKC abolisce, infatti, la proliferazione delle cellule endoteliali indotta da FGF2, ma non la regolazione positiva dell'attivatore del plasminogeno del tipo urochinasi (uPA), suggerendo che le due risposte biologiche possano essere dissociate a livello molecolare.

La degradazione dell'ECM rappresenta un importante passaggio durante la prima fase dell'angiogenesi. Il sistema di attivazione plasmina-plasminogeno e le metalloproteasi (MMP) di matrice cooperano a questa degradazione (Liotta et al, 1991). Il complesso uPA converte il plasminogeno in plasmina (serina proteasi), che degrada la fibrina ed altre proteine di matrice, ed attiva molte MMP, inclusa la stromalisina-1 (MMP-3), la collagenasi-1 (MMP-1) e le collagenasi di tipo IV (MMP-2 ed MMP-9) (Hiraoka et al, 1998). Gli FGF modulano l'espressione del recettore di uPA sulla superficie delle cellule endoteliali e questo permette la localizzazione dell'attività proteolitica sul margine anteriore della cellula in migrazione.

Quindi, i fattori FGF inizialmente promuovono la distruzione della lamina basale, mediante l'induzione della produzione di proteasi; più tardi, essi possono indurre la produzione di vari componenti della ECM da parte delle cellule endoteliali, contribuendo alla maturazione di un nuovo vaso.

Una relazione intima esiste tra FGF2 ed i differenti membri della famiglia dei VEGF durante l'angiogenesi, la linfangiogenesi e la vasculogenesi. Molti esperimenti hanno suggerito la possibilità che FGF2 induca la vascolarizzazione in modo indiretto, attraverso l'attivazione del sistema VEGF/VEGFR. Inoltre, FGF-2 può stimolare l'ematopoiesi e può giocare un ruolo importante nel differenziamento e/o nel funzionamento del sistema nervoso, dell'occhio e dello scheletro.

Sono state proposte molte funzioni di FGF-2 nel sistema nervoso centrale (SNC), ma *in vitro* sembra che esso agisca principalmente sugli astrociti e sui neuroni. Inoltre, FGF2 induce gli oligodendrociti maturi a dedifferenziare ed a proliferare, suggerendo un ruolo del fattore nel meccanismo di rigenerazione dell'oligodendroglia dopo demielinizzazione (Grinspan et al, 1993).

Quindi, FGF-2 potrebbe giocare un ruolo importante nella rigenerazione dopo un danno dell'SNC, attenuando ad esempio un danno ischemico; potrebbe, inoltre, avere un effetto protettivo su differenti tipi di cellule neurali.

L'alterazione dei livelli di FGF-2 e/o dei suoi recettori è, in effetti, associata con numerose patologie del sistema nervoso, incluse alcune malattie neurodegenerative, come Alzheimer, Huntington e Parkinson. In genere, si ha un incremento dell'espressione di FGF-2 che si correla con la gravità della malattia.

I livelli dell'mRNA che codifica FGFR1 sono significativamente aumentati in cellule di glioblastoma umano, rispetto al normale tessuto cerebrale. Coerentemente con questa osservazione, è rilevabile un'assai più elevata immunoreattività per FGFR1 in glioblastoma che in tessuto cerebrale normale. Il normale cervello umano ed alcuni astrocitomi esprimono abbondanti livelli di



FGFR2, ma non di FGFR1; alcune forme di astrocitoma maligno mostrano, invece, una evidente alterazione dell'espressione del recettore dal tipo FGFR2 rispetto al tipo FGFR1b (Bikfalvi et al, 2007).

Il recente riconoscimento che precursori neurali ed attività di neurogenesi sono ancora presenti nel cervello maturo, suggerisce la possibilità che il numero complessivo di neuroni sia finemente regolato per tutta la durata della vita. Candidati per questa regolazione potrebbero essere fattori che regolano la neurogenesi, come ad esempio FGF-2. Esperimenti *in vitro* mostrano che l'iniezione di piccole quantità di FGF-2 in cervelletto neonatale stimola rapidamente la neurogenesi, incrementando la proporzione di precursori dei granuli in mitosi. Inoltre, FGF2 entra nel parenchima del cervello stimolando la mitosi e suggerendo una comunicazione tra il tessuto somatico e le regioni neurogenetiche (Wagner et al, 1999).

Gli FGF sono proteine leganti eparina. L'eparina è un glicosaminoglicano (GAG) carico negativamente rilasciato nel flusso sanguigno durante un'inflammatione. Tuttavia, è più probabile che gli FGF si leghino a proteoglicani contenenti eparan solfato (HSPG) (Presta et al., 2005; Iozzo et al, 2001).

Fra i fattori di crescita implicati nell'angiogenesi vi sono anche i fattori di crescita trasformanti (TGFs), scoperti intorno al 1985. Essi formano una famiglia di citochine, molecole modulatrici che influenzano eventi importanti come la proliferazione, la migrazione e la maturazione cellulare, il riparo di tessuti. Nelle risposte infiammatorie e immunitarie, possono indurre la morte cellulare o, al contrario, la sopravvivenza di molti tipi cellulari (Kingsley, 1994). L'effetto del TGF- $\beta$  dipende fortemente dal contesto cellulare.

Evidenze sperimentali hanno suggerito la possibilità che i TGF giochino un ruolo centrale nell'organizzazione della risposta del cervello a varie sollecitazioni (Kingsley, 1994).

I vari membri della superfamiglia dei TGF $\beta$  sono raggruppati in cinque sottofamiglie: TGF- $\beta$  propriamente detti (isoforme 1, 2 e 3), le attivine, il gruppo delle DVR, il gruppo di decapentaplegico e quello dei 60A. Molti membri di questa famiglia hanno in comune sette cisteine, un caratteristico motivo a cistina ed il fatto di essere sintetizzati sotto forma di precursori più grandi, a partire dai quali il segmento carbossiterminale maturo viene generato per taglio proteolitico. All'interno della sottoclasse dei TGF, il pro-domino può essere secreto anch'esso, sotto forma di complesso con il segmento carbossiterminale maturo, che però rimane in forma biologicamente inattiva e che, solo in seguito ad un taglio proteolitico o ad un abbassamento del pH, viene attivato.

L'attivazione della forma latente di TGF $\beta$  è un importante mezzo per la regolazione della sua attività biologica extracellulare e può agire come interruttore molecolare. L'attivazione, mediata da trombospondina o da proteasi permette il riconoscimento del fattore da parte dei suoi recettori specifici a serina/treonina chinasi, di tipo I e II. La funzione di TGF $\beta$  non è, quindi, intrinseca ma serve

## SEZIONE 2

come meccanismo per accoppiare la cellula al suo ambiente: la cellula ha in pratica una plasticità che consente una risposta appropriata ai cambiamenti che avvengono nel suo ambiente e/o al suo stato interno (Sporn et al, 1990).

I recettori per i TGF e le activine appartengono alla famiglia delle serina/treonina-chinasi transmembrana, che formano complessi eteromerici di recettori di tipo I e II. Infatti, i fattori TGF $\beta$  legano il recettore di tipo II, per il quale hanno un'alta affinità di legame, e, in seguito al legame con questo recettore si ha il reclutamento di uno specifico recettore di tipo I, che lo recluta all'interno del complesso, propagando il segnale.

I TGF $\beta$  possono essere considerati il prototipo del fattore di crescita multifunzionale; sia lo spettro d'azione che gli effetti (regolazione positiva o negativa) dipendono da condizioni contestuali come lo stato delle cellule e il sinergismo con altri fattori di crescita. Questo, insieme all'esistenza di molte isoforme correlate, di recettori diversi e di meccanismi multipli di regolazione dell'attività biologica, pongono i TGF $\beta$  fra le molecole-segnale più versatili. I TGF $\beta$  sono stati ritrovati, ad esempio, nelle cellule mesenchimali e nei loro derivati, inclusi l'osso e tutte le forme di tessuto connettivo, nel muscolo, nell'endotelio, nelle piastrine e nelle cellule del sistema immunitario. Le isoforme TGF $\beta$ 2 e TGF $\beta$ 3 sono le più abbondanti nel sistema nervoso periferico dell'adulto e nel sistema nervoso centrale (Flanders et al, 1991).

Le cellule delle creste neurali producono TGF $\beta$ , lo secernono in forma latente e rispondono esse stesse al TGF $\beta$  con un decremento della loro capacità di produrre attivatore del plasminogeno. Questo suggerisce che la capacità migratoria delle cellule delle creste neurali sia regolata dal TGF $\beta$ , attraverso una stimolazione autocrina o paracrina.

Anche le cellule progenitrici neurali esprimono alti livelli di TGF $\beta$ , con un picco di espressione intorno al decimo giorno di vita post-natale e decrementa subito dopo. Inoltre, neuroni cerebellari in coltura producono TGF $\beta$ 2, e rispondono a questa proteina, se aggiunta dall'esterno, con l'inibizione della proliferazione.

Diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato il ruolo centrale dei TGF $\beta$  come potenti immuno-modulatori e ne hanno messo in luce la duplice funzione: essi possono agire sia come immuno-soppressori che avere un ruolo pro-infiammatorio. Non sorprende, quindi, che le molecole di TGF $\beta$  occupino una posizione centrale nell'organizzazione della risposta del sistema nervoso ad un trauma, ad eventi degenerativi o al danno da sostanze tossiche (Finch et al, 1993).

Alcuni studi hanno dimostrato che le molecole di TGF $\beta$  agiscono in combinazione con altre citochine. Un esempio illustrativo è la regolazione della proliferazione dell'astroglia ad opera di TGF $\beta$  ed FGF-2; l'FGF-2 è mitogeno per l'astroglia ed il TGF $\beta$ , che di per sé ha poco o addirittura nessun effetto sulla crescita dell'astroglia, quando agisce in combinazione con l'FGF-2 diventa uno dei più potenti inibitori della crescita dell'astroglia che si conoscano (Kriegstein et al, 1995).

Nella fase di risoluzione dell'angiogenesi, il reclutamento delle cellule mesenchimali nei nuovi vasi è mediata da fattori quali il PDGF ed il TGF $\beta$ ; in seguito al contatto delle cellule mesenchimali con le EC, la forma latente di TGF $\beta$  è attivata e questo porta all'induzione del differenziamento delle cellule mesenchimali in periciti ed SMC (Hanahan et al, 1996). I periciti contribuiscono in parte alla sopravvivenza ed alla stabilità delle EC, attraverso l'espressione del VEGF.

Curiosamente, il TGF $\beta$  può sia stimolare che inibire la proliferazione delle EC: a basse dosi stimola, mentre ad alte dosi inibisce la proliferazione e la migrazione di queste cellule. Esso, inoltre, è coinvolto nel controllo della permeabilità vascolare, grazie, per esempio, al suo effetto sull'espressione della claudina-5, un componente specifico delle giunzioni strette delle EC (Lebrin et al, 2005; Bertolino et al, 2005).

### *L' angiogenesi nella sclerosi multipla*

La sclerosi multipla (SM) è una malattia cronica neurodegenerativa dovuta alla formazione spontanea e acuta di focolai infiammatori circoscritti, in cui il sistema immunitario promuove un attacco (reazione autoimmune) contro la mielina nel sistema nervoso centrale (SNC)

Essa è quindi una malattia infiammatoria dell'SNC, caratterizzata dalla demielinizzazione degli assoni e dalla conseguente deficienza o completa perdita della trasmissione dell'impulso nervoso. Le aree in cui la mielina è stata danneggiata vengono anche dette placche o lesioni; da qui l'altro nome della malattia: "sclerosi a placche".

L'infiammazione, almeno in parte mediata dall'autoimmunità, è la principale componente trainante della SM; il cervello è normalmente protetto dal sistema immunitario periferico attraverso la barriera emato-encefalica.

E' stato suggerito che l'associazione tra lesioni da SM e neurovascolarizzazione non sia soltanto un epifenomeno (ossia un fenomeno accessorio a quello principale) ma rappresenti, invece, un meccanismo patologico che contribuisce direttamente a determinare la malattia. Se l'angiogenesi rappresenta una componente significativa delle lesioni nella SM e se contribuisce alla progressione della malattia, allora l'inibizione dell'angiogenesi potrebbe sopprimere i cambiamenti patologici, migliorando i segni clinici della malattia.

L'effettiva attivazione di un processo angiogenetico in un particolare tessuto dipende dal rapporto tra fattori pro- e fattori anti-angiogenici. L'angiogenesi è quiescente nell'adulto ma viene attivata in un gran numero di processi patologici, quali tumori, ischemia, retinopatia diabetica e artrite reumatoide (Polverini 1995; Winkler et al, 2000).

La relazione tra vasi sanguigni e lesioni da SM fu sottolineata già da Rindfleisch più di cento anni; egli, infatti, identificò un cambiamento sia nei piccoli che nei grandi vasi nella corda spinale ed era arrivato alla conclusione che tutte le lesioni sono associate a vasi sanguigni anormali.

## SEZIONE 2

In effetti, molte componenti chiave della fisiopatologia della SM sono associate con l'angiogenesi.

Le metalloproteasi di matrice 1, 2, 3 e 9, molecole di adesione intercellulare ed E-selectine che facilitano l'entrata dei monociti attraverso la BBB, nella SM, sono coinvolte nell'alterazione della membrana basale nel processo di angiogenesi. Questa alterazione promuove il rilascio di fattori di crescita e molecole segnale per l'angiogenesi (Dines et al., 1997). I mediatori infiammatori (interferone  $\gamma$  e fattore di necrosi tumorale  $\text{TNF}\alpha/\beta$ ) sono prominenti nella SM e sono anche regolatori dell'angiogenesi. L'endotelina 1 che, in associazione con il VEGF, stimola la neovascolarizzazione correlata con la malignità tumorale e l'induzione della produzione di MMP-2, aumenta in pazienti con SM. La stessa cosa vale per il VEGF, che aumenta sia nella SM che nella EAE (Rashid et al, 2002).

Rashid et al. (2002) hanno mostrato un incremento del numero di vasi nelle lesioni infiammatorie, nei pazienti con sclerosi multipla di tipo Recidivante-Remittente (RRMS) e quelli con sclerosi multipla di tipo Secondaria progressiva (SPSM) rispetto ai controlli. Una conseguenza di queste osservazioni è che l'inibizione dell'angiogenesi avrebbe il potenziale di alleviare l'infiammazione cronica; la soppressione della neovascolarizzazione impedirebbe, infatti, ai nutrienti ed alle cellule infiammatorie di raggiungere il sito dell'infiammazione. Ciò eviterebbe l'attivazione delle cellule endoteliali, la proliferazione ed il rimodellamento vascolare, inibendo la produzione di fattori come le MMP, i recettori del VEGF e le citochine, prodotti dalle cellule endoteliali.

D'altra parte, terapie che inducono l'angiogenesi in modelli animali possono aiutare a capire se un incremento nella vascolarizzazione contribuisca ad accelerare la progressione della malattia.

Va però ricordato come diverse evidenze suggeriscano che la rivascolarizzazione sia necessaria al fine di promuovere il riparo neurale e la rigenerazione. Da questo punto di vista, la mancata formazione di nuovi vasi sanguigni potrebbe anche essere dannosa (Zhang et al, 1997; Kirk et al, 2004).

### *Bibliografia*

1. Risau W. **Mechanisms of angiogenesis.** *Nature.* 1997 Apr 17; 386(6626): 671-4.
2. Beck L Jr, D'Amore PA. **Vascular development: cellular and molecular regulation.** *FASEB J.* 1997 Apr;11(5):365-73
3. Carmeliet P. **Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.** *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):389-95
4. Moses M.A. **The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinase and their inhibitors.** *Stem Cells* 1997 15, 180-189
5. Thurston G., Suri, Smith K. **Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1.** *Science* 1999; 286:2511-251

6. Thurston G., Rudge JS., Ioffe E. **Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage.** *Nat. Med* 2000; 6:460-463
7. Benjamin L.E., Hemo I. & Keshet E. **A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-b and VEGF.** *Development* 1998 125, 1591-1598
8. Klagsbrun M. and Moses M.A. **Molecular angiogenesis** Chemistry & Biology 1999; 6:217-224
9. Hellstrom M., Kalen M., Lindahl P. **Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse.** *Development* 1999; 126:3047-3055
10. Eliceiri B.P.& Cheresh D.A. **The role of  $\alpha_v\beta_3$  integrins during angiogenesis.** *Mol. Med.* 1998; 4, 741-750
11. Brooks P.C., & Cheresh D.A. **Integrin  $\alpha_v\beta_3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels.** *Cell* 1994 79, 1157-1164
12. Aplin AE, Howe A., Alamari SK, Juliano RL **Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors:the role of integrino, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.** *Pharmacol Rev* 1998, 50:197-263
13. Meredith JE Jr, Fazeli B., Schwartz MA **The extracellular matrix as a cell survival factor.** *Mol Biol Cell* 1993; 4:953-961
14. Byzova VT, Goldman KC, Pampori N, Thomas AK, Bett A, Shattil JS, Plow FE **A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins.** *Mol Cell* 2000, 6:851-860
15. Eliceiri B.P.& Cheresh D.A. **Adhesion events in angiogenesis** *Current Opinion in Cell Biology* 2001; 13:563-568
16. Folkman J., Klagsburn M. **Angiogenic factors** *Science* 1987; 235:442-447
17. Maragoudakis ME., Gullino PM., Lelkes PI. **Angiogenesis. Molecular biology, clinical aspect.** 1994 *Plenum Press New York*
18. Radisavljevic Z., Avraham H., Avraham S. **Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/nitric oxide pathway and modu migration of brain microvascular endothelial cells.** *J Biol Chem* 2000; 275(27): 20770-20774
19. Josko J., Gwozdz B., Jedrzejowska-Szypulka H., Hendryk S. **Vascular endothelial growth factor ( VEGF) and its effect on angiogenesis** *Med Sci Monit* 2000; 6(5):1047-1052
20. Plate KH., Warnke PC. **Vascular endothelial growth factor.** *J. Neurooncol*, 1997; 35:365-372
21. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D. **Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte**

## SEZIONE 2

- procoagulant activity, and promotes monocyte migration.** *J Exp Med.* 1990 Dec 1;172(6):1535-45
22. Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X., Lakso M., Rauvala H., Awartz M., Fukumura D., Jain RK., Alitalo K. **Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice.** *Science* 1997; 276:1423-1425
  23. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA **Ftl-1 an ftl-1 related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors.** *Development* 1993; 118:489-498
  24. Ferrara N. **Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis** *Kidney International* 1999; 56:794-814
  25. Miao H-Q and Klagsburn M. **Neuropilin is a mediator of angiogenesis.** *Cancer and metastasis Review* 2000; 19: 29-37
  26. Klagsbrun M. & D'Amore P. **Regulators of angiogenesis.** *Annu Rev Physiol.* 1991; 53: 217-239
  27. Javerzat S., Auguste P., Bikfalvi A. **The role of fibroblastic growth factors in vascular development.** *Trends Mol Med* 2002; 8: 483-489
  28. Presta M., Dell'Era P, Mitola S., Moroni E., Ronca R. and Rusnati M. **Fibroblastic growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis** *Cytokine & Growth factor reviews* 2005; 16:159-178
  29. Liotta L.A., Steeg PS Stetler-Stevenson WG. **Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation** *Cell* 1991; 64:327-336
  30. Hiraoka N., Allen E., Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. **Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins.** *Cell* 1998; 95:365-377
  31. Gualandris A., Urbinati C., Rusnati M., Ziche M., Presta M. Interaction of high-molecular-weight basic fibroblastic growth factor with endothelium: biological activity and intracellular fate of human recombinant M (r) 24,000 bFGF. *J Cell Physiol* 1994; 161:149-159
  32. Grinspan JB, Stern JL, Franceschini B, Pleasure D **Trophic effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on differentiated oligodendroglia: a mechanism for regeneration of the oligodendroglial lineage.** *J Neurosci Res* 1993; 36: 672-680
  33. Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G., And Rifkin D. **Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2** *Endocrine Review* 2007; 18(1): 26-45
  34. Wagner J.P., Black I.R. and DiCicco-Bloom E. **Stimulation of Neonatal and Adult Brain Neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblastic growth factor** *J Neurosci.* 1999; 19(14): 6006-6016
  35. Presta M., Tiberio L., Rusnati M., Dell'Era P., Ragnotti G. **Basic fibroblastic growth factor requires a long-lasting activation of protein kinase C to induce cell proliferation in transformed fetal bovine aortic endothelial cells.** *Cell Regul* 1991; 2: 719-726

36. Iozzo RV, San Antonio JD. **Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena.** *J Clin Invest.* 2001 Aug;108(3): 349-55. Review.
37. Kingsley D.M. **The TGF- $\beta$  superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organism.** *Genes Dev.* 1994; 8:133-146
38. Sporn M.B. and Roberts A.B. **TGF-  $\beta$ : problems and prospects.** *Cell regulation* 1990; 1:875-882
39. Cheifetz S., Weatherbee J.A., Tsang M. L.-S., Anderson J.K., Mole J.E., Lucas R. and Massague J. **The transforming growth factor-  $\beta$  system: A complex pattern of crossreactive ligands and receptors.** *Cell* 1987; 48:409-415
40. Flanders K.C., Ludecke G., Engels S., Cissel D.S., Roberts A.B., Kondaiah P., Lafyatis R., Sporn M.B. and Unsicker K. **Localizations and actions of transforming growth factor-  $\beta$ s in the embryonic nervous system** *Development* 1991; 113:183-191
41. Finch C.E., Laping N.J., Morgan T.E., Nichols N.R. and Pasinetti G.M. **TGF- $\beta$ 1 organizer of responses to neurodegeneration.** *J Cell Biochem.* 1993; 53:314-322
42. Kriegstein K., Rufer M., Suter-Crazzolara C. and Unsicker K. **Neural functions of the transforming growth factors  $\beta$ .** *Int .J. Dev. Neuroscience* 1995; 13(3-4):301-315
43. Hanahan D., Folkman J **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenesis switch during the tumorigenesis** *Cell* 1996; 86:353-364
44. Lebrin F., Deckers M., Bertolino P. and Dijke P. **TGF-  $\beta$  receptor function in the endothelium** *Cardiovascular Research* 2005; 65:599-608
45. Bertolino P. and Lebrin F. **Transforming growth factor- $\beta$  signal transduction in angiogenesis and vascular disorders** *Chest* 2005; 128:585-590
46. Polverini PJ **The pathophysiology of angiogenesis.** *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6(3): 230-247
47. Winkler JD, Jackson JR. *Chronic inflammation and angiogenesis.* In: Rubanyi GM,editor. **Angiogenesis in Health and Disease: Basic Mechanism and clinical Applications.** New York: Marcel Dekker; 2000; 407-416
48. Dines K.C., Powell H.C. **Mast cell interactions with the nervous system:relationship to mechanisms of disease.** *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56(6): 627-640
49. Rashid W., Parkers L.M., Ingle G.T., Chard D.T., Symms M., Tofts P.S. **Comparative investigation of cerebral perfusion in multiple sclerosis using a novel technique.** USA: ECTRIMS; 2002
50. Zhang Z., Guth L. **Experimental spinal cord injury: Wallerian degeneration in the dorsal column is followed by revascularization, glial proliferation, and nerve regeneration.** *Exp Neurol* 1997; 147(1):159-171

## SEZIONE 2

51. Kirk S., Frank J.A., Karlik S. **Angiogenesis in multiple sclerosis: is it good, bad or an epiphenomenon** J. Neurological Sciences 2004; 217: 125-130